第 37 卷第 2 期
2017 年 1 月

生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA

Vol.37,No.2
Jan.,2017

DOI: 10.5846/stxb201508081673

冯树丹, 李晓慧, 汪洋洲, 张军, 徐文静, 张正坤, 王德利, 李启云.二种交配型球孢白僵菌对亚洲玉米螟的生态控制作用.生态学报,2017,37(2):650-658.

Feng S D, Li X H, Wang Y Z, Zhang J, Xu W J, Zhang Z K, Wang D L, Li Q Y. Ecological control of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) by two cloned *Beauveria bassiana* strains. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(2): 650-658.

二种交配型球孢白僵菌对亚洲玉米螟的生态控制作用

冯树丹[1], 李晓慧[1,2], 汪洋洲[2], 张　军[2], 徐文静[2], 张正坤[2], 王德利[3], 李启云[2,*]

1 哈尔滨师范大学, 哈尔滨　150025

2 吉林省农业科学院植物保护研究所,公主岭　136100

3 东北师范大学, 长春　130024

摘要:利用生物种间互做关系抑制农业害虫的暴发是生物防治的重要手段。为探讨二种交配型内共生球孢白僵菌与玉米之间的互惠关系及其形成的共生体在亚洲玉米螟控制中的生态效应,以玉米为宿主植物,以球孢白僵菌孢子悬浮液进行灌根,在温室内构建了二种交配型(MAT1-1-1 型,B5;MAT1-2-1 型,B2)球孢白僵菌-玉米共生体,并研究了共生体对玉米的生长、对亚洲玉米螟的产卵选择和幼虫发育及其对球孢白僵菌生物学特性的影响。结果显示:通过叶片离体培养、ITS 基因和交配型基因 MAT 检测,均能检测到白僵菌的内生定殖;MAT1-2-1 型 B2 菌株定殖检出率高,MAT1-1-1 型 B5 菌株在混合型接种中定殖有优势。回收后的球孢白僵菌菌落直径和毒力无显著性变化,但其产孢量都显著提高其中回收 B5 处理组来源菌株的产孢量提高最显著。接种过球孢白僵菌的玉米植株地上部生长速度、生物量和地下根系生物量均优于对照组,其中根系干重明显增加,而地上植株干重也相对增加。MAT1-1-1 型菌株 B5 对共生体玉米植株地上高度促生长贡献明显;MAT1-2-1 型菌株 B2 对共生体玉米植株地下干重增加贡献明显。总体上球孢白僵菌内生定殖对玉米地下根系生物量影响大于对地上植株生物量的影响。在产卵选择性试验中,各处理组亚洲玉米螟的产卵量显著少于对照组。共生体对亚洲玉米螟产卵具有明显的趋避作用,MAT1-2-1 型菌株 B2 对产卵的趋避作用明显,而 MAT1-2-1 型菌株 B5 的趋避作用较弱。在人工接种幼虫的试验中,处理组回收的亚洲玉米螟幼虫存活率均显著低于对照组,其中,B5 组回收幼虫的存活率最低,仅为 38.33%;处理组的化蛹率与对照组差异不显著,但 B5 组的回收幼虫化蛹率显著低于 B2 组和对照组,仅为 34.77%,这说明 MAT1-1-1 型 B5 菌株对玉米螟幼虫发育抑制最明显。上述结果表明,不同交配型球孢白僵菌内生定殖效率有差异,在经过内生定殖后在产孢量方面有显著性提高,两个交配型菌株在联合应用时具有协同增效作用;两个交配型菌株均能够通过内生定殖与玉米形成共生体并促进玉米植株的生长,这显示球孢白僵菌和玉米之间已经建立具有互惠关系的共生体。这种共生体通过趋避亚洲玉米螟产卵、抑制幼虫存活和降低化蛹率等方面的潜力虽然不一样,但都有助于对亚洲玉米螟的可持续生态防治,也证明了共生体的建成有效提高了玉米的生态适应性,为利用球孢白僵菌内共生性实施亚洲玉米螟防控提供了新思路。

关键词:球孢白僵菌;交配型;亚洲玉米螟;生态控制

Ecological control of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) by two cloned *Beauveria bassiana* strains

FENG Shudan[1], LI Xiaohui[1,2], WANG Yangzhou[2], ZHANG Jun[2], XU Wenjing[2], ZHANG Zhengkun[2], WANG Deli[3], LI Qiyun[2,*]

1 *Harbin Normal University*, *Harbin* 150025, *China*

2 *Institute of Plant Protection*, *Jilin Academy of Agricultural Sciences*, *Gongzhuling* 136100, *China*

3 *Northeast Normal University*, *Changchun* 130024, *China*

基金项目:黑龙江自然科学基金项目(C201307);吉林省科技厅重大科技攻关项目(20140203006NY)

收稿日期:2015-08-08;　　**网络出版日期:**2016-06-13

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: qyli1225@ 126.com

Abstract: Ecological control methods are important for controlling agricultural pests. The Asian corn borer (ACB), *Ostrinia furnacalis* (Guenée), has been an extremely serious pest, that cause severe reduction in corn yields. The ubiquitous entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* has been used to suppress populations of the European corn borer (ECB), *O. nubilalis*, and ACB globally. Most studies have focused on the application of *B. bassiana*, with limited studies on the relationship between the fungus, corn, and insects. Our previous research indicated that *B. bassiana* with two mating-gene types, MAT1-1-1 and MAT1-2-1, could colonize corn. These mating-type genes had mutation sites cloned from endophytic fungal strains, which revealed corn plants and insects could impact fungal evolution. The purpose of the present study was to create endophytic symbiosis and determine the interaction among *B. bassiana* (entophytic fungus), corn plants, and ACB. We created a *B. bassiana*-corn endophytic symbiosis by inoculating two mating-gene type *B. bassiana* strains (MAT1-1-1 type B5 and MAT1-2-1 type B2) into corn plants in a suspension with a concentration of 1×10^7 spores/mL. The effect of endophytic symbiosis on the growth of corn plants, oviposition preference of ACB adults, development of ACB larvae, and biological variation of *B. bassiana* were evaluated in the greenhouse. The results showed that endophytic *B. bassiana* could be detected from corn leaves in vitro by culture. ITS and mating-type gene amplification and sequencing confirmed the successful creation of endophytic symbiosis. The MAT1-2-1 type B2 treatment group showed a higher endophytic detection rate than MAT1-1-1 type B5, whereas MAT1-1-1 type B5 was more successful during co-inoculation than MAT1-2-1 type B2. The variation of the colony diameter and virulence of the recovered *B. bassiana* were not significant, but the sporulation quantity improved significantly, and the EN-B5 strain (recovered from the B5 treatment) changed the most obviously. The height of corn plants and dried biomass of treatment groups were higher than the CK group, while the underground root biomass significantly improved. The B5 strain contributed more to above-ground plant height and the B2 strain contributed more to underground root biomass. ACB moths were released into nylon-meshed cages. Egg quantity showed a significant difference in all treatment groups, which was lower than that in the CK group. Egg fecundity rate in the B2 group was 3.33%, but 53.33% in the CK group; therefore, the B2-corn endophytic symbiosis group was not the preferred host for ACB egg laying. The ACB larval survival rate and weight in treatment groups were significantly lower than those in the CK group. The ACB pupation rate of treatment groups was not significantly lower than that of the CK group, but there was a significant difference between B5 and B2 groups; the B5 group had the lowest survival (38.33%) and pupation rates (34.77%). These results demonstrated that the sporulation quantity of the recovered *B. bassiana* strains significantly improved, and the synergism of the two strains with different mating-type genes was shown. The two *B. bassiana* mating-types could colonize in corn plants and mutualistic endophytic symbiosis was formed, which reinforced corn growth and improved the resistance against pests. *B. bassiana*-corn endophytic symbiosis is important for the sustainable management of pests by inhibiting oviposition and suppressing larval and pupal development. The results also proved that mutualistic symbiosis could improve the ecological adaptability of *B. bassiana* and corn, which offered a new strategy for ACB control using endophytic symbiosis through the application of *B. bassiana*.

Key Words: *Beauveria bassiana*; mating types; *Ostrinia furnacalis*; ecological control

在自然与农业生态系统中,生物种间关系是复杂的。例如,昆虫病原真菌对昆虫种群数量起着重要的调控作用,可以利用这一特性开展对农作物害虫的生物防治或生态调控。已有研究表明,一些昆虫病原真菌除可以直接应用于害虫防治外,还能够在自然状态下或人工接种方式内生定殖在植物中形成共生体,不仅导致植株生长过程中的一系列生理生化变化,影响其代谢活动和营养利用效率等,起到促生作用、提高其抗逆性(抗病虫和抗非生物胁迫等)和生态适应性,亦直接或间接地影响着宿主病原菌或昆虫的生长与发育,从而深刻地影响着三者生态系统的生物结构和组成[1-6]。

通常把能够在植物中能够定植生长的昆虫病原菌称为内生真菌。其中,球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是

目前研究最多的植物内生昆虫病原真菌之一,其能够直接或间接地影响植物的代谢过程,同时对植物相关的害虫本身、种群参数及其植物病害也有着双重的控制和影响[7-17]。Bing 和 Lewis 在 1991 年首次利用白僵菌植物内生性开展了害虫防治研究[7],他们用球孢白僵菌分生孢子悬液对玉米叶面进行喷施开展欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* (Hübner)防治研究,表明叶面处理组能极大程度的降低欧洲玉米螟蛀孔数量。其后,1992 年,他们采用茎基部注射的方法接种处于散粉期的玉米,发现注射的球孢白僵菌能够侵入到玉米植株中,并沿着植株维管束向上扩散[18-19]。他们调查发现 1623 条死亡欧洲玉米螟幼虫中只有 65 条僵虫,且在这些玉米植株中也未发现球孢白僵菌分生孢子的存在,因此,他们推测定殖在玉米植株体内的球孢白僵菌可能是分泌大量对欧洲玉米螟具有毒性的物质而非孢子感染途径控制欧洲玉米螟。

国内外对于利用内生球孢白僵菌控制亚洲玉米螟种群机理和应用的研究很少。本实验室张军[20]建立了球孢白僵菌不同交配型分子鉴定体系。随后,李晓慧等[21]利用不同交配型球孢白僵菌构建了球孢白僵菌-玉米共生体。结果显示不同交配型球孢白僵菌在亚洲玉米螟定殖检测率有差异,且定殖回收后的球孢白僵菌交配型基因 MAT1-1-1 发生了变异,而交配型基因 MAT1-2-1 无变异。据此推测,在内生定殖过程中球孢白僵菌菌株与玉米植株之间会产生相互作用;不同交配型菌株之间也产生了相互作用。而且这种相互作用在提高玉米生态适应性和对生态控制亚洲玉米螟的同时,也在一定程度上引起了球孢白僵菌的表型和遗传背景的改变。为此,选取前期工作中所使用的两种球孢白僵菌菌株 BbOFDH1-5(MAT1-1-1 型,B5)和 BbDPSD2(MAT1-2-1 型,B2),在玉米幼苗期灌根接种,比较回收菌株与释放原始菌株的生物学特性和毒力,比较研究不同交配型球孢白僵菌菌株对玉米植株生长及其共生体抗虫活性的影响。这将为今后改进生态防治中的球孢白僵菌育种技术、应用剂型、施用方式与策略提供新思路。

1 材料和方法

1.1 供试菌株与昆虫

供试球孢白僵菌为 BbOFDH1-5 和 BbDPSD2 菌株,交配型分别为单一的 MAT1-1-1 型(B5)和 MAT1-2-1 型菌株(B2)。菌种和亚洲玉米螟,均为本实验室分离保存培养或饲养。

1.2 玉米种植及球孢白僵菌接种处理

选用吉单 209 玉米种子,以 1%的次氯酸钠表面消毒 5 min,无菌水冲洗 5 次,播入装有灭菌基质(田间土壤与营养土体积比 1:1,121℃灭菌 1.5 h)的花盆中。每盆保证 1 株苗。

待玉米幼苗长到三叶期时,对玉米幼苗进行灌根接种处理。接种白僵菌孢子悬液的浓度为 1×10^7 个孢子/mL,每株接种 20 mL。

1.3 内生-球孢白僵菌的分离与鉴定

1.3.1 内生球孢白僵菌的分离

每个处理组接种白僵菌 14 d 后,选择新鲜的活体健康植株。参照 Soroush 等方法[17],叶片经表面消毒后,并剪裁均匀,放入 PDA 培养基平板(直径 60 mm)上进行检测,分离获得内生白僵菌。

1.3.2 内生球孢白僵菌的分子鉴定

将回收内生白僵菌和原始菌株接种到 SDY 培养基里,26 ℃、180 r/min 培养 3—4 d。收集菌丝并提取 DNA,方法参照文献[22]。交配型基因(MAT1-1-1/MAT1-2-1)的扩增和分析参照李晓慧等方法进行[21]。rDNA-ITS 片段的扩增和分析参照 WHITE 等的方法[23]。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。所得 rDNA-ITS 测序结果,利用分析软件 DNAMAN 将其序列与释放原菌株的 rDNA-ITS 相比对。

1.3.3 内生球孢白僵菌的菌落直径和产孢量测试

将回收内生白僵菌和原始菌株分别接种到 PDA 培养基平板上,接种后放入生化培养箱培养(26℃,RH=90%),每个菌株重复 3 次,待其充分产孢后观察其菌落形态特征。

采用稀释法进行单孢分离测定。分别取各菌株的分生孢子于含有 0.01%吐温-80 的无菌水中配制孢子悬

浮液,孢子悬浮液含有 200 个孢子/5 μL 左右时,用无菌枪头吸取 5μL 孢子悬浮液滴入到 PDA 培养基平板中。每菌株重复 3 次,待菌落长到第 10 天时采用十字交叉法测量并记录菌落直径。

待菌落长到第 14 天时,测量 1 g 孢子粉的产孢量。把 0.1 g 孢子粉放入 100 mL 含有 0.01%吐温-80 的无菌水中,在旋涡振荡器上充分振荡分散后,配制成孢子悬浮液。每个菌株取样 3 次,滴在血球计数板上,镜检孢子数,计算测定产孢量。

$$1\ cm^2 菌落含孢量 = (平均每小格孢子数\times4\times10^6\times稀释倍数)/(3.14\times0.16)$$

1.3.4　内生球孢白僵菌的室内毒力测试

以 3 龄亚洲玉米螟幼虫为试虫。从不同处理组分离出来的菌株中随机选择 3 株进行杀虫活性测定。采用亚洲玉米螟非琼脂半人工饲料配方进行饲料配制[24],配制成 1×10^8 CFU/mL 白僵菌孢子浓度的带菌饲料。将带菌饲料用灭菌药匙分装置于 24 孔细胞培养板(约 1 g/孔)备用。将 3 龄幼虫单头接入带菌饲料的孔板中,每个处理组 24 头,6 次重复。对照处理为吐温-80 的无菌蒸馏水配制的无菌饲料饲喂。将接入幼虫的培养板置于 26℃、相对湿度 60%—80%、L∶D=14 h∶10 h 恒温培养箱。接种的第 2 天起连续调查 10 d。观察记录幼虫生长状态和每个处理组幼虫死亡数量。

1.4　不同交配型球孢白僵菌-玉米共生体对玉米生长影响

试验设接种 B5、接种 B2、接种 B5+B2 等量混合 3 个处理组,以浇灌无菌水为对照组 CK,每个处理重复 40 盆,置于温室(白天温度(26±2)℃,夜间温度(20±2)℃,相对湿度 50%,光照 12 h/d),每周浇 1 次营养液。

植物生长和生物量的测定:在玉米植株生长 35 d、63 d 和 91 d 时,每组选定 40 株,测定植株株高;100 d 时,测定植株干生物量(65℃,36 h)等指标。

1.5　不同交配型球孢白僵菌-玉米共生体对亚洲玉米螟产卵偏好和生长发育的影响

1.5.1　共生体对亚洲玉米螟成虫产卵影响的调查

本试验采用罩笼接成虫的方法,调查不同玉米-球孢白僵菌共生体对亚洲玉米螟成虫产卵的偏好性影响。在玉米植株 3 叶期扣罩笼,罩笼采用带有尼龙纱网的网笼(80 cm×70 cm×80 cm)罩住供试盆栽的玉米植株上,底部垫以木板,每个罩笼含 B5、B2 或 B5 + B2 处理组的盆栽玉米植株各 1 盆,没有侵染球孢白僵菌菌株的对照组 1 盆,每个罩笼含 4 盆玉米植株,随机摆放,花盆间摆放距离一致,每盆 1 株玉米,并保持叶面积相对一致, 5 次重复。在玉米植株 7 叶时期,每个罩笼内释放亚洲玉米螟刚羽化的成虫 5 对,释放后立即用图钉将网笼与木板固定,以防成虫逃逸。整个试验期间,不进行任何化学防治。于释放玉米螟成虫一周后统计不同处理植株上的卵块数。以产卵反应指数(ORI)[25]来衡量测试带有不同交配型球孢白僵菌的植株对雌蛾产卵选择反应的引诱或趋避作用,其计算公式为:

$$ORI = (Nt - Nc)/N$$

式中,Nt 为处理组卵块数;Nc 为对照组卵块数;N 为总产卵块量。

1.5.2　共生体对亚洲玉米螟幼虫存活率和化蛹率的影响

本试验采用发育测定的方法,当玉米植株长到抽雄期,选取发育良好的无虫供试植株,侵染球孢白僵菌的 B5 组、B2 组、B5+B2 组的盆栽玉米植株各 10 盆,没有侵染球孢白僵菌菌株的对照组 10 盆,4 次重复。每个花盆的间隔 50 cm,每株玉米内接种亚洲玉米螟 3 龄幼虫 3 头。每隔 2—3 d,记录幼虫存活情况;直至成虫羽化时实验结束,检查玉米植株上的亚洲玉米螟存活量、化蛹量等情况;然后计算各处理组和对照组的平均存活率和平均化蛹率等。

1.6　数据分析

采用 DPS 15.10 数据处理系统和 Microsoft Excel 软件分析。地上植株高度、地上部分干重、地下部分干重、产孢量、菌落直径、幼虫平均体重、幼虫存活率和化蛹率采用完全随机设计;生测矫正死亡率,采用随机区组设计。方差分析使用单因素实验统计分析,多重比较采用 Duncan 氏新复极差法。

$$死亡率(\%) = 死亡数/供试虫数\times100\%$$

校正死亡率(%)=(处理组死亡率±对照组死亡率)/(100-对照组死亡率)×100%。

2 结果分析

2.1 不同交配型球孢白僵菌-玉米共生体的构建及回收菌株生物学特性分析

在不同处理组玉米叶片的PDA检测平板中,处理组玉米植株组织上,均出现了白色略带灰黄色粉末状菌落(图1),菌落厚实,菌丝生长随时间推移不断向外扩展蔓延。没有接种的CK对照组未检测到白僵菌菌落。

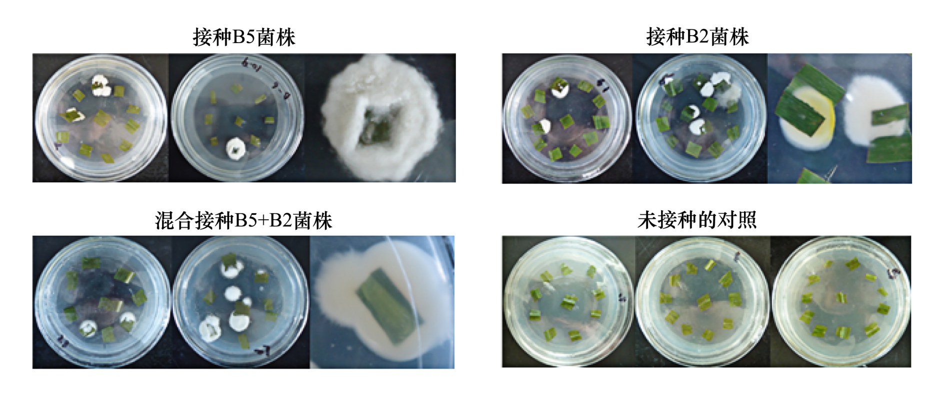


图1 不同处理组玉米叶片离体检测内生白僵菌的菌落形态

Fig.1 Morphology of entophytic *B. bassiana* colonies from corn leaves cultured in vitro

分别对接种前原始菌株和不同处理组回收内生菌株进行了分子鉴定。不同处理组回收菌株分别随机选取3株。内生真菌分别标记为EN-B5-01、EN-B5-02、EN-B5-03;EN-B2-14、EN-B2-17、EN-B2-19;EN-B5+B2-23、EN-B5+B2-25、EN-B5+B2-27。总DNA经PCR扩增均检测到rDNA-ITS、MAT1-1-1和MAT1-2-1基因(图2)。其中,B5处理组回收的菌株谱带为MAT1-1-1型,B2处理组回收的菌株谱带为MAT1-2-1型,而B5+B2等量混合处理组回收菌株中均含有MAT1-2-1型交配型。EN-B5+B2-23和EN-B5+B2-27含有MAT1-1-1型交配型,EN-B5+B2-25仅含有MAT1-2-1交配型,这显示MAT1-2-1交配型菌株B2定殖检测率较高,但是从交配型基因扩增谱带浓度看,回收的混合型菌株中B5占一定优势。所得rDNA-ITS测序结果与释放原菌株的rDNA-ITS相比对同源性为100%,这显示回收菌株来源于释放菌株。

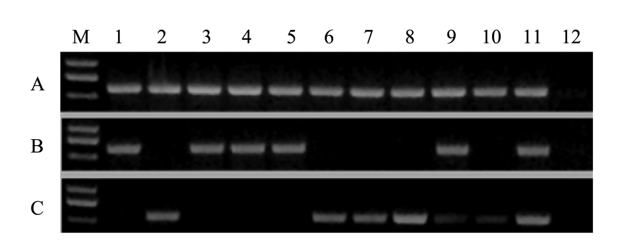


图2 不同处理组回收内生定殖菌落rDNA-ITS和MAT序列扩增结果

Fig.2 Amplification of rDNA-ITS and MAT sequences from endophytic colonies of different inoculation group

A:ITS扩增谱带 ITS amplification products;B:MAT1-1-1扩增谱带 MAT1-1-1 amplification products;C:MAT1-2-1扩增谱带 MAT1-2-1 amplification products;M:DNA分子标准样品 DNA marker;泳道1-12样品分别为:B5、B2、EN-B5-01、EN-B5-02、EN-B5-03、EN-B2-14、EN-B2-17、EN-B2-19、EN-B5+B2-23、EN-B5+B2-25、EN-B5+B2-27、无菌水对照

经过纯化后分离的不同菌株,在PDA培养基上的外观形态表现出一定差异。经过内生的白僵菌均表现出营养生长旺盛,大多数菌落纯白色,菌丝生长过程中常产生枯黄色代谢水珠。EN-B5+B2在形态上与EN-B5和EN-B2相比对,其菌落较为厚实;EN-B5和EN-B2相比没有较大的差异。11株供试菌株菌落直径、产孢量存在着明显差异(表1):菌株B5、EN-B5+B2-23、EN-B5+B2-25菌落直径≥40.5 cm,表现出良好的生长特性;菌株EN-B5-3、EN-B2-19、EN-B5+B2-23产孢量均在8.68×10^{8}孢子/mL以上。总体上看,释放原B5菌株比释放原B2菌株菌落生长速度要优;EN-B5类菌株产孢量为最优。

以3龄亚洲玉米螟幼虫为试虫,测定12株球孢白僵菌(组合)的杀虫活性。结果显示(表1),未经过内生阶段的原始菌株的致病性强于内生真菌处理组。B5+B2菌株组合对亚洲玉米螟有较强致病性的为,处理5 d

校正死亡率达(71.52±0.59)%,10d 校正死亡率达(83.98±0.78)%,缩短了杀虫周期且具有显著的协同增效作用。

表 1　球孢白僵菌原始菌株和回收定殖菌株的生物学特性及对亚洲玉米螟毒力测试校正死亡率

Table 1　Biological characteristics of original and recovered *B. bassiana* and their corrected mortality on *O. furnacalis*

处理 菌株编号 Strains No	生物学特性 Biological characteristics		玉米螟生测校正死亡率 Corrected mortality of ACB	
	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量(×10^8个/mL) Sporulation quantity	5d 校正死亡率/% Corrected mortality for 5 days	10d 校正死亡率/% Corrected mortality for 10 days
B5	43.50±1.05a	4.89±0.34de	58.31±0.87bc	74.25±1.25ab
EN-B5-1	36.67±2.58bc	4.58±0.50ef	56.95±0.89bc	70.07±1.46ab
EN-B5-2	36.61±2.32bc	7.87±0.33c	59.01±0.85bc	73.55±1.29ab
EN-B5-3	37.23±2.12bc	9.57±0.33a	53.45±0.97c	67.99±1.57b
B2	32.00±1.62d	3.95±0.56c	67.47±0.80ab	79.86±0.98ab
EN-B2-14	31.80±4.98d	7.75±0.53c	61.80±0.80abc	79.13±1.02ab
EN-B2-17	30.94±2.64d	5.17±0.39de	56.93±0.90bc	74.94±1.22ab
EN-B2-19	31.23±3.96d	8.68±0.37b	54.15±0.95bc	70.78±1.44ab
B5+B2	—	—	71.52±0.59a	83.98±0.78a
EN-B5+B2-23	40.60±1.78ab	8.81±0.31b	65.27±0.73ab	79.81±0.98ab
EN-B5+B2-25	41.00±3.46ab	5.35±0.36d	59.70±0.84bc	70.76±1.42ab
EN-B5+B2-27	35.27±1.00cd	5.67±0.38d	61.09±0.81abc	75.54±1.29ab
CK			0.00±0.00	0.00±0.00

表格中菌落直径和产孢量为平均值±标准差

2.2　不同交配型球孢白僵菌对玉米生物量的影响

图 3、图 4 显示了不同处理组玉米植株的高度和生物量。结果表明,在植株地上平均高度方面,3 个生长阶段统计数据表现出相同趋势差异,处理组 B5、B2、B5+B2 植株的 63 d 和 91 d 的平均高度均显著高于对照组(F=3.034,P=0.0304)。在植株地上平均干重方面, 100 d 植株平均干重,B5 组和 B2 组与对照组没有显著差异,但是 B5 + B2 组与对照组有显著性差异(F=3.295,P=0.0217)。同样,处理组 B5 组和 B2 组与对照组没有显著差异,但 B5+B2 与对照组有显著性差异(F=18.573,P<0.001)。综合分析,接种过球孢白僵菌的玉米植株的地上部生长高度、生物量和根重均优于对照组。

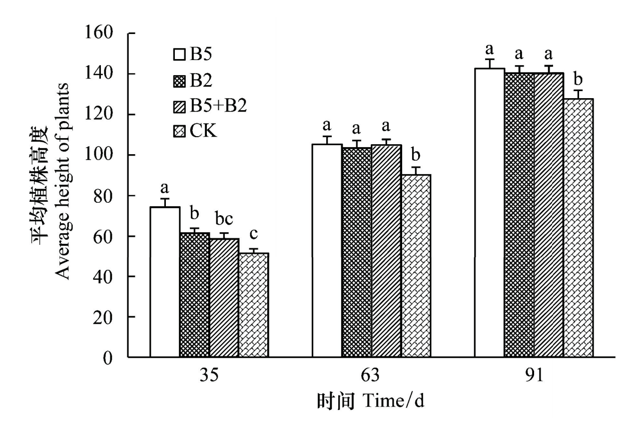


图 3　不同处理组不同生长时期玉米植株的地上平均高度

Fig.3　Average height of corn among different groups during different growth stages

标注相同字母的不同处理间在 0.05 水平上差异不显著;误差棒为标准差

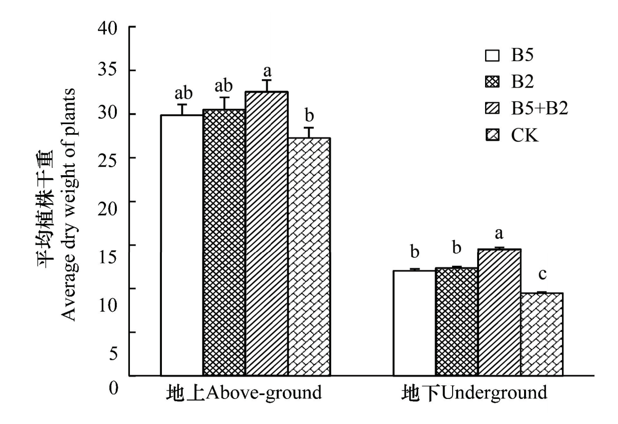


图 4　不同处理组玉米植株的平均干重

Fig.4　Average dry weight of corn among different groups

标注相同字母的不同处理间在 0.05 水平上差异不显著;误差棒为标准差

2.3 不同交配型球孢白僵菌-玉米共生体对亚洲玉米螟成虫产卵的趋避影响

表 2 显示了不同处理组雌蛾产卵的状况。结果表明,亚洲玉米螟雌蛾在处理组玉米植株上所产的卵量显著少于对照,其中 B2 处理组的卵量最少,且显著少于 B5 组处理,但与 B5+B2 混合处理组中的卵量差异不显著。测试雌蛾群体对处理组玉米植株的平均产卵反应指数 ORI 值均显著的小于 0(表 2)。这一结果说明玉米-内生球孢白僵菌共生体对亚洲玉米螟雌蛾产卵具有显著的趋避作用,各组的趋避程度大小依次为 B2>B5+B2>B5。

表 2　不同处理组对亚洲玉米螟成虫产卵的影响

Table 2　Different treatment groups bioassay fecundity statistical results

处理组 Treatment group	平均每株卵块量 No. of egg mess	ORI 值 ORI value
B5	1.80 ± 0.80 b	−0.233
B2	0.20 ± 0.20 c	−0.500
B5+B2	0.80 ± 0.37 bc	−0.400
CK	3.20 ± 0.80 a	0.000

* 图中数据为平均值±标准误; ORI: Overposition response index

2.4 不同交配型球孢白僵菌-玉米共生体对亚洲玉米螟幼虫体重、存活率和化蛹率的影响

表 3 结果表明,对照组幼虫较处理组幼虫体重无显著差异;3 个处理组中 B5 组的亚洲玉米螟幼虫存活率显著低于对照组($F=0.425$,$P<0.001$),而 B2 组和 B5+B2 组与对照没有差异($F=0.0.025$,$P=0.260$);不同处理间仅 B5 组的化蛹率显著低于 B2 组。综合幼虫存活率和化蛹率的数据来看,在接种过球孢白僵菌的玉米植株能显著的抑制亚洲玉米螟幼虫的存活和化蛹,各组的抑制程度大小依次为 B5>B5+B2>B2。

表 3　不同处理组的存活率和化蛹率

Table 3　Survival and Pupation rate of different treatment groups

处理 Treatment	幼虫平均重量 Average weight of larvae /mg	存活率 Survival rate/%	化蛹率 Pupation rate/%
B5	74.02±27.05a	38.33±2.15 c	34.77±2.88 b
B2	81.33±37.93a	62.50±0.83 b	42.76±2.71 a
B5+B2	76.02±31.02a	65.00±0.96 b	40.99±1.72 ab
CK	83.22±25.51a	80.83±1.60 a	41.33±2.14 ab

图中数据为平均值±标准误; 存活率=存活幼虫数量/接虫数量; 化蛹率=化蛹数量/存活幼虫数量

3 结论与讨论

球孢白僵菌是重要的虫生真菌,是应用最为广泛的生物防治杀虫真菌之一,在我国已经成功应用于亚洲玉米螟和马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* Walker 的防治。近 10 年来,吉林省在应用白僵菌防治亚洲玉米螟的面积逐年增加,现年防治面积稳定在 33 万 hm^2左右,累计防治面积超过 200 万 hm^2,防治工作的实施为减少玉米产量损失、提高玉米品质和促进农民增收起到了至关重要的作用,并大量降低了化学农药的投入,保护了环境和天敌,产生了显著的生态效益。但是,随着气候变化、秸秆还田面积逐年上升、种植结构调整等因素的影响,东北地区亚洲玉米螟的发生规律逐年变化,对利用白僵菌进行生物防治工作提出了新的要求。

本研究首次采用不同交配型基因(MAT1-1-1,MAT1-2-1)标记不同株系的球孢白僵菌,接种玉米构建白僵菌-玉米共生体来研究其对亚洲玉米螟的生态控制作用。MAT1-1-1(Ⅰ型)和 MAT1-2-1(Ⅱ型)两种交配型是球孢白僵菌产生有性世代的必要条件之一[26-27]。采用交配型基因和 rDNA-ITS 基因对不同菌株进行遗传标记来研究内生真菌与寄主植物形成的共生体,为共生体的建立和回收的内生白僵菌菌株的鉴定提供了快捷准确途径,是研究球孢白僵菌内生定殖及互作机理的前提。本研究通过体外组织分离培养和基因扩增证实成功构建了球孢白僵菌-玉米内共生体,并证明回收的内生白僵菌来源于接种菌株,由于两个菌株混合等量接种

后分离到了混合交配型菌株,其交配型基因扩增显示 MAT1-2-1 型菌株 B2 定殖检出率高,但 MAT1-1-1 型菌株 B5 在混合型菌株中有优势,其是否与自然界中不同交配型菌株比例不平衡或生态适应性能力有相关性还有待于进一步研究来证明。进一步的生物学特性数据显示球孢白僵菌回收菌株营养生长较原始菌株旺盛,菌落直径大小和致病力有所下降但无显著性差异,但是其产孢量普遍显著提高,说明球孢白僵菌在玉米植株内生定殖过程中确实发生了表型可塑性的改变。

内生真菌定殖的发生能够促进植物、牧草生长或影响生物群落的生物多样性[28-29],具有不同基因型的植物内生真菌与寄主植物形成共生关系后,对植物的生长发育和生物量的影响不同[30]。本研究发现不同交配型内生-球孢白僵菌对宿主植物生物量影响显著,处理与对照相比较,其植株地上高度和地上地下生物量均有明显提高,不同交配型球孢白僵菌内共生对寄主植物的促生作用强度不一样,交配型 MAT1-1-1 型 B5 菌株对地上植株高度增强作用明显,交配型 MAT1-2-1 型菌株 B2 对地上地下生物量的提高作用明显,而 B5+B2 混合处理组的地下根干重又显著高于 B5 组和 B2 组,这不仅说明内生菌的促生作用与交配型有关,而且也与不同交配型菌株之间的相互作用有关,不同交配型菌株之间的配合使用具有协同增效作用;同时,由于处理组的地下根系干重显著高于对照组,我们推测共生体的形成对地下根系的影响大于对地上部分的影响,进一步对植株地上植株与地下部分生物量的总体分配产生了较大的影响,其中 B5+B2 组尤为明显。

球孢白僵菌可以与寄主植物形成共生体,且具有控制害虫种群作用,主要通过孢子感染引起植食昆虫的僵化死亡[31-33]、产生毒性物质影响发育或产生营养竞争等实现[34]。还有研究进展显示,内生真菌作为异养生物,与植株所形成的共生体对植食性昆虫的作用效果,与内生真菌的种类和基因型是有关的[35-36]。本研究结果显示在亚洲玉米螟雌蛾产卵时,它会更多的主动选择在没有接种球孢白僵菌或球孢白僵菌定殖率低的玉米植株上产卵,并且能有效地避开球孢白僵菌感染较多的 B2 组植株。这一现象在多食性昆虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对接种内生真菌直立顶孢霉 *Acremonium strictum* 番茄叶片的产卵趋避作用也可观测到[37]。进一步的幼虫接种实验结果显示,当亚洲玉米螟取食不同交配型球孢白僵菌接种的玉米植株时,虽然处理组存活幼虫的重量与对照组的幼虫没有显著差异,但与对照组相比,其处理组幼虫存活率会降低。同时,通过两种不同交配型菌株构建的共生体处理间的化蛹率存在显著差异,其中,经 MAT1-1-1 型菌株 B5 单一接种的玉米植株的抗虫性,无论是存活率还是化蛹率都显著低于单一接种 MAT1-2-1 型菌株 B2,这进一步说明两个不同交配型菌株在与玉米形成共生体后,通过共生体控制亚洲玉米螟的潜力存在差异。

综合以上结论,不同交配型球孢白僵菌在经过内生定殖后,玉米能够利用球孢白僵菌与其形成的共生体来促进自身生长和提高玉米在农业生态系统中的适应性。这种互惠关系的建成进一步通过趋避亚洲玉米螟产卵和抑制其幼虫发育、化蛹等实现对亚洲玉米螟的可持续生态防治。在这个过程中,不同交配型菌株对玉米的促生作用和其对亚洲玉米螟的生态控制潜力均得到了实现,还在一定程度上实现了物种间的协同进化,这为今后白僵菌施用方式提供了新思路。

参考文献(References):

[1] 王学霞, 杨民和, 王国红. 植物-内生真菌共生体对昆虫种群的影响. 生态学报, 2009, 29(10): 5618-5626.

[2] 荆元芳, 吴连杰, 马传洋, 任安芝, 高玉葆. 不同浓度和形态磷处理下内生真菌感染对高羊茅的影响. 生态学报, 2014, 34(13): 3576-3583.

[3] 王欣禹, 周勇, 任安芝, 高玉葆. 内生真菌感染对宿主羊草抗病性的影响. 生态学报, 2014, 34(23): 6789-6796.

[4] Arnold A E, Lewis L C. Ecology and evolution of fungal endophytes and their roles against insects//Vega F E, Blackwell M, eds. Insect-Fungal Assciations: Ecological and Evolution. Oxford: Oxford University Press, 2005: 74-96.

[5] Quesada-Moraga E, López-Díaz C, Landa B B. The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. PLoS One, 2014, 9(2): e89278.

[6] Cory J S, Hoover K. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. Trends in Ecology & Evolution, 2006, 21(5): 278-286.

[7] Bing L A, Lewis L C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin. Environmental Entomology, 1991, 20(4): 1207-1211.

[8] Gurulingappa P, Sword G A, Murdoch G, McGee P A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when *in planta*. Biological Control, 2010, 55(1): 34-41.

[9] Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S. Effect of endophytic *Beauveria bassiana* on populations of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and their damage in tissue-cultured banana plants. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2008, 129(2): 157-165.
[10] Ownley B H, Griffin M R, Klingeman W E, Gwinn K D, Moulton K J, Pereira R M. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 98(3): 267-270.
[11] Tefera T, Vidal S. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. BioControl, 2009, 54(5): 663-669.
[12] Posada F, Vega F E. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Mycoscience, 2006, 47(5): 284-289.
[13] Akello J, Dubois T, Coyne D, Kyamanywa S. The effects of *Beauveria bassiana* dose and exposure duration on colonization and growth of tissue cultured banana (*Musa* sp.) plants. Biological Control, 2009, 49(1): 6-10.
[14] Brownbridge M, Reay S D, Nelson T L, Glare T R. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. Biological Control, 2012, 61(3): 194-200.
[15] Vega F E, Posada F, Aime M C, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner S A. Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control, 2008, 46(1): 72-82.
[16] Bitsadze N, Jaronski S, Khasdan V, Abashidze E, Abashidze M, Latchininsky A, Samadashvili D, Sokhadze I, Rippa M, Ishaaya I, Horowitz A R. Joint action of *Beauveria bassiana* and the insect growth regulators diflubenzuron and novaluron, on the migratory locust, *Locusta migratoria*. Journal of Pest Science, 2012, 86(2), 293-300.
[17] Parsa S, Ortiz V, Vega F E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. Journal of Visualized Experiments, 2013, (74): e50360.
[18] Bing L A, Lewis L C. Endophytic *beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *ostrinia nubilalis* (hübner). Biocontrol Science and Technology, 1992, 2(1): 39-47.
[19] Bing L A, Lewis L C. Temporal relationships between *Zea mays*, *ostrinia nubilalis* (*Lep.*: *Pyralidae*) and endophytic *Beauveria bassiana*. Entomophaga, 1992, 37(4): 525-536.
[20] 张军, 赵强, 汪洋洲, 张正坤, 李启云. 球孢白僵菌交配型分子鉴定//中国植物保护学会成立 50 周年庆祝大会暨 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国植物保护学会, 2012.
[21] 李晓慧, 汪洋洲, 张军, 徐文静, 张正坤, 刘艳微, 孟鑫睿, 冯树丹, 李启云. 不同交配型球孢白僵菌在玉米植株中的定殖及其交配型基因变异比较研究. 中国生物防治学报, 2014, 30(6): 743-749.
[22] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
[23] White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. 38-Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics//Innis M A, Gelfand D H, John J. Sninsky J J, White T J, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
[24] 宋彦英, 周大荣, 何康来. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用. 植物保护学报, 1999, 26(4): 324-328.
[25] 何康来, 文丽萍, 王振营, 周大荣, 丛斌. 几种玉米气味化合物对亚洲玉米螟产卵选择的影响. 昆虫学报, 2000, 43(S1): 195-200.
[26] Yokoyama E, Yamagishi K, Hara A. Structures of the mating-type loci of *Cordyceps takaomontana*. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 5019-5022.
[27] Faeth S H, Hayes C J, Gardner D R. Asexual endophytes in a native grass: tradeoffs in mortality, growth, reproduction, and alkaloid production. Microbial Ecology, 2010, 60(3): 496-504.
[28] de Battista J P, Bacon C W, Severson R, Plattner R D, Bouton J H. Indole acetic acid production by the fungal endophyte of tall fescue. Agronomy Journal, 1990, 82(5): 878-880.
[29] Clay K, Holah J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. Science, 1999, 285(5434): 1742-1744.
[30] Morse L J, Faeth S H, Day T A. *Neotyphodium* interactions with a wild grass are driven mainly by endophyte haplotype. Functional Ecology, 2007, 21(4): 813-822.
[31] Wagner B L, Lewis L C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3648-3473.
[32] Gurulingappa P, Sword G A, Murdoch G, McGee P A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when *in planta*. Biological Control, 2010, 55(1): 34-41. (本条文献与第 8 条文献重复, 请核对)
[33] Bing L A, Lewis L C. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Agriculture, Ecosystems & Environment, 1993, 45(1/2): 147-156.
[34] Campos R A, Boldo J T, Pimentel I C, Dalfovo V, Araújo W L, Azevedo J L, Vainstein M H, Barros N M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Genetics & Molecular Research, 2010, 9(3): 1421-1430.
[35] Sullivan T J, Faeth S H. Gene flow in the endophyte *Neotyphodium* and implications for coevolution with *Festuca arizonica*. Molecular Ecology, 2004, 13(3): 649-656.
[36] Clay K. Interactions among fungal endophytes, grasses and herbivores. Researches on Population Ecology, 1996, 38(2): 191-201.
[37] Jallow M F A, Dugassa-Gobena D, Vidal S. Influence of an endophytic fungus on host plant selection by a polyphagous moth via volatile spectrum changes. Arthropod-Plant Interactions, 2008, 2(1): 53-62.